

Interações gene-ambiente na perturbação do espectro do autismo

Gene-environment interactions in autism spectrum disorder

João Xavier Santos¹⁻⁴; Célia Rasga^{1,2}; Ana Rita Marques¹⁻⁴; Muhammad Asif¹⁻⁴; Astrid Moura Vicente^{1,2,4,5}

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(3) Programa doutoral BioSys - Sistemas Biológicos, Genómica Funcional e Integrativa. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(4) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(5) Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.

_Resumo

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) tem uma heritabilidade estimada de 50%, indicativa de uma componente genética que pode ser modulada por fatores ambientais. A evidência de associação com autismo de alguns compostos potencialmente tóxicos levou-nos a colocar a hipótese de que genes envolvidos em processos de destoxificação e regulação da permeabilidade de barreiras fisiológicas (p. ex. placenta, hematoencefálica) são candidatos para a PEA. Neste trabalho definimos uma lista de 519 genes de destoxificação e das barreiras de permeabilidade, e comparamos a frequência de *Copy Number Variants* (CNVs) nestes genes em 2446 crianças com PEA, recrutadas através do *Autism Genome Project* (AGP), com 10355 controlos sem patologia neuropsiquiátrica da *Database of Genomic Variants*. Como validação, foram avaliados indivíduos com PEA da *Simons Foundation Autism Research Initiative* (SFARI) (N=1124). Verificou-se que 555 (22,7%) indivíduos com PEA apresentavam CNVs contendo 173 dos 519 genes de interesse, 31 dos quais foram encontrados exclusivamente em pacientes com PEA, enquanto 23 genes eram significativamente mais frequentes em CNVs de indivíduos com PEA do que em controlos. Múltiplos dos genes identificados estão envolvidos no transporte através de barreiras fisiológicas ou na destoxificação de toxinas relevantes para a PEA. Este estudo reforça a hipótese de que, em indivíduos geneticamente suscetíveis, a exposição a fatores ambientais potencialmente tóxicos pode contribuir para a PEA.

_Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) has an estimated heritability of 50%, indicating a genetic component that may be modulated by the environment. Recent studies implicate exposure to specific toxins in ASD etiology. We thus hypothesize that genes involved in detoxification and regulation of physiological barrier permeability processes (e.g. placenta, blood-brain barrier) are plausible candidates for ASD etiology. In this study we defined a candidate list of 519 detoxification and barrier permeability genes that may interact with toxicants relevant for ASD. We compared the frequency of *Copy Number Variants* (CNVs) targeting these genes in 2446 ASD patients, recruited through the *Autism Genome Project*, and 10355 controls without neuropsychiatric disease from the *Database of Genomic Variants*, and validated results in 1124 ASD subjects from the *Simons Foundation Autism Research Initiative*. We found that 173 of the 519 detoxification and barrier genes were targeted by CNVs from 555 (22.7%) individuals with ASD. Of these genes, 31 were exclusively targeted by CNVs in ASD subjects and 23 were significantly more frequent in ASD than in controls.

Network analysis showed that many of these genes are involved in the transport through physiological barriers or the detoxification of potential toxicants relevant for ASD. This study reinforces the hypothesis that the exposure to environmental factors in genetically susceptible individuals may contribute to ASD risk.

_Introdução

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma perturbação do neurodesenvolvimento, fenotipicamente complexa, com uma prevalência global estimada em cerca de 1% e um rácio masculino:feminino de 1:4. Esta condição é caracterizada por défices na comunicação e interação social e comportamentos repetitivos e estereotipados, aos quais podem estar associadas outras alterações de comportamento e comorbilidades ⁽¹⁾.

Na última década, estudos de grande dimensão identificaram um número significativo de fatores genéticos que contribuem para a suscetibilidade para o autismo. Múltiplas variantes genéticas raras, em particular alterações nucleotídicas e Variantes de Número de Cópias (*Copy Number Variants*, CNVs), são responsáveis por uma fração considerável dos casos de PEA ⁽²⁾. No entanto, as alterações genéticas identificadas não explicam totalmente a etiologia desta condição. Estudos recentes estimam a heritabilidade da PEA em cerca de 50% ⁽³⁾, sugerindo um papel importante de fatores epigenéticos e ambientais. Esta hipótese é reforçada pela observação consistente de que a exposição pré-, peri e pós-natal a potenciais toxinas ambientais, incluindo metais pesados, ftalatos ou bisfenol A, está associada ao desenvolvimento da perturbação ^(4,5). Atualmente, um modelo poligénico e multifatorial, assumindo interações entre genes e ambiente, é uma possível explicação para a PEA.

As barreiras fisiológicas de permeabilidade, incluindo a placenta, a barreira hematoencefálica e os cílios respiratórios, são cruciais na regulação da exposição a toxinas ambientais, particularmente durante o neurodesenvolvimento. Processos de destoxificação são fundamentais para a remoção das toxinas pelo organismo. Assim, colocamos a hipótese de que genes que codificam moléculas envolvidas nestes processos são possíveis candidatos na mediação de uma maior suscetibilidade ao efeito de toxinas ambientais, em indivíduos com PEA.

_Objetivo

Neste estudo pretendemos identificar variantes em genes de destoxificação e das barreiras de permeabilidade que possam interagir com fatores ambientais na PEA, e detetar situações em que uma suscetibilidade genética às referidas toxinas possa contribuir para o desenvolvimento da perturbação.

_Materiais e métodos

Fatores ambientais relevantes para a etiologia da PAE e genes envolvidos nos processos de destoxificação e permeabilidade das barreiras (genes-alvo) foram selecionados através de revisão sistemática da literatura e de bases de dados, incluindo a *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org/) ⁽⁶⁾ e a *The Toxin and Toxin-Target Database* (www.t3db.ca/) ⁽⁷⁾. Para a identificação de interações entre os genes-alvo e fatores ambientais relevantes para a PEA, a *Comparative Toxigenomics Database* (<http://ctdbase.org/>) ⁽⁸⁾ foi utilizada.

CNVs que incluíam genes-alvo e o respetivo padrão de transmissão foram obtidos de dois *datasets* de indivíduos com PEA: *Autism Genome Project* (AGP) ⁽²⁾ (n=2446) e *Simons Foundation Autism Research Initiative* (SFARI) ⁽⁹⁾ (n=1124). Como controlo, foram usados dados de duas populações constituídas por indivíduos adultos (n=10355), sem historial de doença neurológica, ^(10,11) publicamente acessíveis através da *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). As populações com PEA e controlo selecionadas foram genotipadas utilizando plataformas da Illumina.

A análise estatística (Teste de Fisher ou Teste do χ^2) foi realizada usando o ambiente de desenvolvimento integrado R. O teste de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicado.

_Resultados

Da literatura e bases de dados, foram identificadas 8 toxinas particularmente relevantes para a PEA e 519 genes envolvidos nos processos de destoxificação e permeabilidade das barreiras (genes-alvo) (**tabela 1 e figura 1**). A presença destes genes em CNVs de indivíduos com PEA dos *datasets* AGP e SFARI foi analisada.

No *dataset* AGP, 555 (22,7%) dos indivíduos com PEA apresentavam CNVs contendo 173 (33,3%) dos 519 genes-alvo (**tabela 1**). Destes 173 genes, 31 eram alterados por CNVs apenas em indivíduos com PEA e não por CNVs de indivíduos controlo (**tabela 1**). O gene mais frequentemente deletado ou duplicado por CNVs exclusivamente na PEA foi o *STS* (0,49%), seguido de *CYP2D6* e *ARSF*. Dos 173 genes-alvo, 23 apresentavam-se alterados por CNVs com uma frequência significativamente superior em indivíduos com PEA comparativamente a controlos, após correção de Bonferroni para comparações múltiplas ($P < 3.52 \times 10^{-4}$) (**tabela 1**). Entre estes encontravam-se 8 genes que codificam UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), três genes que codificam glutathionas S-transferases (GSTs) e dois genes codificantes de proteínas do sistema de transporte molecular ABC (ABCs). Observou-se uma tendência para um aumento na percentagem de duplicações em relação a deleções que incluem os genes-alvo, em particular para genes exclusivamente encontrados em CNVs de indivíduos com PEA. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Relativamente ao padrão de transmissão de CNVs contendo genes-alvo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas havendo, no entanto, um aumento do número de CNVs *de novo* contendo genes exclusivamente ou mais frequentemente presentes em indivíduos com PEA. Isto poderá sugerir um potenciamento do efeito de toxinas ambientais por variantes não herdadas dos pais em indivíduos com PEA.

Os resultados do *dataset* AGP foram validados usando o grupo de pacientes do *dataset* SFARI. 8 dos 31 genes exclusivos da PEA e 7 dos 23 genes mais frequentes na PEA no AGP foram também encontrados exclusivamente ou em frequência significativamente superior em indivíduos com PEA no *dataset* SFARI (**tabela 1**).

artigos breves_ n. 6

Verificou-se ainda que 48 dos 54 genes associados à PEA interagem com uma ou várias das 8 toxinas relevantes para esta perturbação. A maioria destas toxinas atravessa barreiras fisiológicas e funciona como disruptores endócrinos. Foi notado que genes como *ABCC1*, *ABCG2* e *GSTM1* são ubíquos, interagindo com várias toxinas (figura 1). Outros genes como, *STS* e alguns *UGTs*, têm alvos mais específicos.

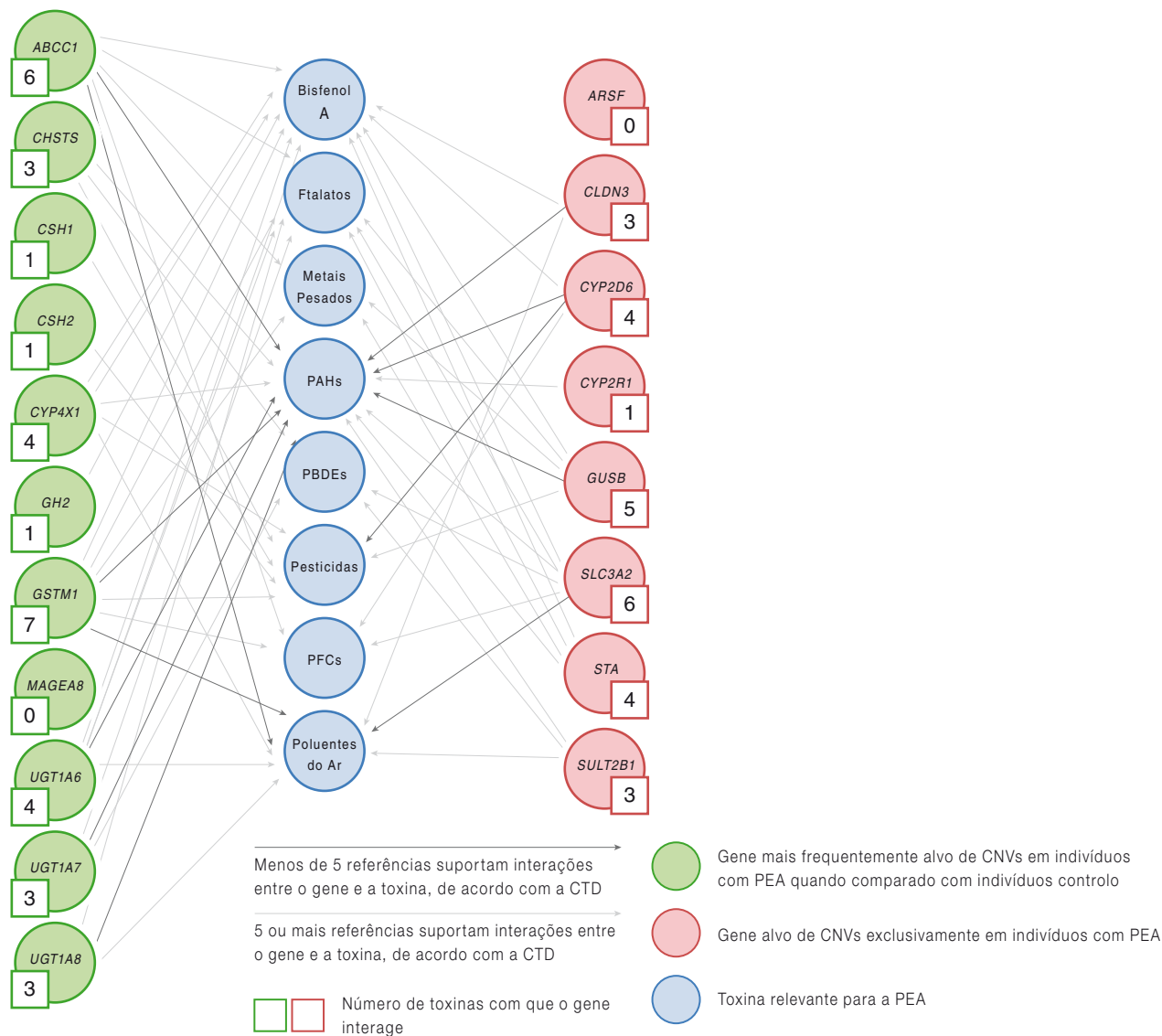
Processos relacionados com metabolismo de xenobióticos encontram-se enriquecidos nos genes encontrados (*CYP450s*, *UGTs*, *GSTs* e *ARSs*). Notavelmente, o gene *GSTM1*, que codifica uma enzima envolvida na destoxificação de toxinas ambientais e produtos de stresse oxidativo, foi previamente implicado na etiologia da PEA (12).

Tabela 1: Associação de genes-alvo duplicados ou deletados por CNVs com a Perturbação do Espectro do Autismo (dados dos *datasets* AGP e SFARI).

Genes mais frequentemente encontrados em CNVs de indivíduos com PEA, comparativamente a indivíduos controlos, após correção para comparações múltiplas									Genes exclusivamente encontrados em CNVs de indivíduos com PEA		
Gene	Dataset AGP				Dataset SFARI				Gene	Dataset AGP	Dataset SFARI
	AGP n(%)	DGV n(%)	Estatística de Teste	P-value	SFARI n(%)	DGV n(%)	Estatística de Teste	P-value		AGP n(%)	SFARI n(%)
<i>GSTM1</i>	20 (0,82)	5 (0,05)	56.21	6.5x10 ⁻¹⁴	2 (0,18)	5 (0,05)	1.07	1.4x10 ⁻⁰¹	<i>STS</i>	12 (0,50)	7 (0,62)
<i>CYP4X1</i>	17 (0,70)	2 (0,02)	56.48	6.6x10 ⁻¹¹	7 (0,62)	2 (0,02)	16.44	2.6x10 ⁻⁰⁶	<i>CYP2D6</i>	9 (0,37)	5 (0,44)
<i>CHST5</i>	33 (1,35)	38 (0,37)	32.85	9.9x10 ⁻⁰⁹	23 (2,05)	38 (0,37)	50.96	9.4x10 ⁻¹³	<i>ARSF</i>	5 (0,20)	1 (0,09)
<i>CSH1</i>	19 (0,78)	13 (0,13)	31.09	2.5x10 ⁻⁰⁸	9 (0,80)	13 (0,13)	20.76	5.2x10 ⁻⁰⁶	<i>GUSB</i>	3 (0,12)	1 (0,09)
<i>UGT1A8</i>	14 (0,57)	6 (0,06)	30.35	3.6x10 ⁻⁰⁸	3 (0,27)	6 (0,06)	3.30	5.0x10 ⁻⁰²	<i>CLDN3</i>	1 (0,04)	4 (0,36)
<i>MAGEA8</i>	16 (0,65)	9 (0,09)	29.81	4.8x10 ⁻⁰⁸	15 (1,33)	9 (0,09)	69.78	6.6x10 ⁻¹⁷	<i>CYP2R1</i>	1 (0,04)	1 (0,09)
<i>UGT1A10</i>	13 (0,53)	6 (0,06)	26.83	2.2x10 ⁻⁰⁷	3 (0,27)	6 (0,06)	3.30	5.0x10 ⁻⁰²	<i>SLC3A2</i>	1 (0,04)	1 (0,09)
<i>UGT1A6</i>	11 (0,45)	5 (0,05)	22,43	2.2x10 ⁻⁰⁶	3 (0,27)	5 (0,05)	4.17	3.6x10 ⁻⁰²	<i>SULT2B1</i>	1 (0,04)	1 (0,09)
<i>UGT1A7</i>	11 (0,45)	5 (0,05)	22.43	2.2x10 ⁻⁰⁶	3 (0,27)	5 (0,05)	4.17	3.6x10 ⁻⁰²			
<i>UGT1A9</i>	11 (0,45)	5 (0,05)	22.43	2.2x10 ⁻⁰⁶	3 (0,27)	5 (0,05)	4.17	3.6x10 ⁻⁰²			
<i>ABCC1</i>	11 (0,45)	4 (0,04)	25.16	7.7x10 ⁻⁰⁶	8 (0,71)	4 (0,04)	14.63	2.9x10 ⁻⁰⁶			
<i>CSH2</i>	14 (0,57)	12 (0,12)	18.15	2.0x10 ⁻⁰⁵	8 (0,71)	12 (0,12)	17.41	3.0x10 ⁻⁰⁵			
<i>GH2</i>	14 (0,57)	13 (0,13)	16.71	4.4x10 ⁻⁰⁵	8 (0,71)	13 (0,13)	16.01	6.3x10 ⁻⁰⁵			

O valor de *P* foi calculado usando o teste χ^2 ou Teste de Fisher, consoante o cumprimento dos pressupostos. Para ambos os *datasets* foi aplicada correção de Bonferroni para comparações múltiplas: *dataset* AGP: $P < 3.52 \times 10^{-4}$; *dataset* SFARI: $P < 4.46 \times 10^{-4}$. A cinza estão assinalados valores de *P* que têm significado estatístico em ambos os *dataset* AGP e SFARI.

Figura 1: Interações gene-ambiente potencialmente relevantes para a PEA.



Na figura estão representadas interações entre genes exclusivamente ou mais frequentemente encontrados em CNVs de indivíduos com PEA, quando comparado com controlos, e 8 toxinas ambientais relevantes para a perturbação. A *Comparative Toxigenomics Database* (CTD) foi usada para identificar as interações entre os genes e as toxinas ambientais. PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos; PBDEs – Éteres de Difenila Polibromados; PFCs – Compostos Perfluorados

Conclusões

Ao demonstrar que genes envolvidos na destoxificação de xenobióticos e na regulação da permeabilidade das barreiras são exclusivamente ou mais frequentemente alterados por CNVs em indivíduos com PEA, reforçamos a hipótese de que a exposição a fatores ambientais em indivíduos geneticamente suscetíveis pode contribuir para a PEA.

Futuramente, iremos avaliar um grupo de crianças portuguesas com PEA em que dados de exposição ambiental, recolhidos através de um questionário específico, de codificação geográfica e de análise de matrizes biológicas, serão integrados com dados genéticos e com informação clínica. Nomeadamente, dentes decíduos, que são um repositório para a exposição a toxinas durante diferentes fases do neurodesenvolvimento, serão analisados.

Referências bibliográficas:

- (1) Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res.* 2012;5(3):160-79.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763210/
- (2) Pinto D, Delaby E, Merico D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet.* 2014;94(5):677-94.
- (3) Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, et al. The familial risk of autism. *JAMA.* 2014;311(17):1770-7.
- (4) Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics.* 2011;128(2):344-55.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387855/
- (5) Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, et al. Gene x Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry.* 2014;5:53.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4120683/
- (6) Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
- (7) Wishart D, Arndt D, Pon A, et al. T3DB: the toxic exposome database. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D928-34. Epub 2014 Nov 5.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383875/
- (8) Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2017. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D972-D978. Epub 2016 Sep 19.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210612/
- (9) Fischbach GD, Lord C. The Simons Simplex Collection: a resource for identification of autism genetic risk factors. *Neuron.* 2010;68(2):192-5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.006>
- (10) Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171215/
- (11) Shaikh TH, Gai X, Perin JC, et al. High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. *Genome Res.* 2009;19(9):1682-90. <http://genome.cshlp.org/content/19/9/1682.long>
- (12) Kanduri C, Kantojärvi K, Salo PM, et al. The landscape of copy number variations in Finnish families with autism spectrum disorders. *Autism Res.* 2016;9(1):9-16. Epub 2015 Jun 6.